

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

11 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 758 188

21 N° d'enregistrement national : 97 00074

51 Int Cl<sup>6</sup> : G 01 N 35/00

12

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 07.01.97.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 10.07.98 Bulletin 98/28.

56 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.*

60 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

71 Demandeur(s) : LAMONTAGNE MICHEL — FR.

72 Inventeur(s) :

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire :

54 PORTOIR POUR L'AUTOMATISATION DE L'USAGE DES MICROPLAQUES DE FILTRATION ET D'EXTRACTION (SPE) DE PARTICULES ET DE MOLECULES DANS DES ECHANTILLONS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES.

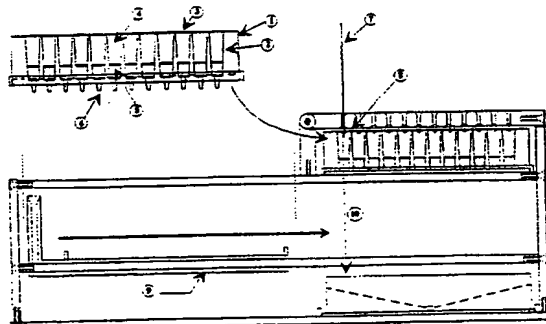
57 La présente invention concerne un dispositif permettant d'automatiser l'usage de plaques de microtitration à puits profonds particulièrement conçues pour la préparation d'échantillons liquides, chimiques ou biologiques, comme étape intermédiaire d'un procédé d'analyse, et mettant en oeuvre un ou plusieurs liquides déposés dans les puits de ladite plaque (1). Chacun des 96 puits (2) contient des moyens perméables permettant la rétention de particules ou de molécules.

L'extrémité inférieure de chaque puits (6) possède un orifice permettant l'écoulement des fluides déposés dans la moitié supérieure de chaque puits.

Selon l'invention, les différents liquides sont déposés dans la moitié supérieure de chaque puits de la microplaque, par groupe de 2 à 8 puits simultanément, par un appareil automatique doté d'aiguilles d'injection (7). Ces aiguilles d'injection perforent une plaque en élastomère souple (8) qui, déposée et maintenue sur la partie supérieure de la microplaque à puits profonds, assure une étanchéité permanente de l'ensemble des puits de ladite microplaque.

L'invention concerne également un obturateur de flux mobile (9) permettant une dérivation de la ligne de fluide (10) issue de l'extrémité inférieure de chaque puits (6) doté

d'un orifice, cette dérivation pouvant s'effectuer à tout moment du déroulement du protocole. §.



FR 2 758 188 - A1



La présente invention concerne un dispositif permettant d'automatiser l'usage de plaques de microtitration à puits profonds (1) particulièrement conçues pour la préparation d'échantillons liquides, chimiques ou biologiques, comme étape intermédiaire d'un procédé d'analyse, et mettant en oeuvre un ou plusieurs liquides déposés simultanément ou successivement dans les puits de la dite plaque. Cette microplaque est composée de 96 puits profonds (2). Chaque puits est un cylindre dont l'extrémité supérieure (3) est ouverte à l'atmosphère. La moitié supérieure (4) est un réservoir destiné à recevoir des liquides; la moitié inférieure (5) contient des moyens perméables permettant la rétention de particules ou de molécules. L'extrémité inférieure de chaque puits possède un orifice (6) permettant l'écoulement des fluides déposés dans la moitié supérieure de chaque puits.

L'objectif numéro 1 de cette préparation d'échantillons liquides consiste à déplacer les liquides déposés dans la partie supérieure (4) des puits de la microplaque vers et au-delà de l'extrémité inférieure de ces puits, de façon reproductible, entre tous les puits d'une même microplaque.

L'objectif numéro 2 réside dans le fait que le traitement de tous les échantillons d'une même microplaque soit effectué dans le temps le plus court possible.

Pour cela, il existe plusieurs procédés.

Le premier procédé consiste à laisser l'effet de la pesanteur agir sur les liquides déposés. Ce procédé nécessite un temps très long et ne répond pas aux critères de l'objectif numéro 2.

Le second procédé consiste à associer l'extrémité inférieure des puits de la microplaque (1) à un boîtier sous vide qui créera une dépression par rapport à l'extrémité supérieure (3) des puits restant ouverts à la pression atmosphérique. Ce procédé augmente la vitesse de transfert des liquides dans chacun des puits, mais la perméabilité des moyens de rétention (5) contenus dans les puits n'étant pas constante, la vitesse de transfert n'est pas régulière et reproductible d'un puits à l'autre. Ce procédé ne répond pas à l'objectif numéro 1 du procédé.

Le troisième procédé consiste à appliquer une pression dans la moitié supérieure du puits (4), provoquant ainsi une accélération du flux. Cette surpression est assurée par un bouchage étanche placé à l'extrémité supérieure du cylindre constituant le puits (3). Ce procédé est déjà utilisé dans une autre application utilisant des cartouches individuelles équipées de bouchons dotés d'une ouverture permettant le

passage d'une aiguille d'injection. Ce procédé, bien que plus fiable, présente certains inconvénients.

Le premier inconvénient est que le système existant est dédié à l'usage de cartouches individuelles traitées une à une, et non à l'usage de plaques de microtitration à puits profonds (1) particulièrement conçues pour la préparation d'échantillons liquides (en particulier, adaptées à la SPE).

Le second inconvénient est que l'étanchéité n'est assurée que lorsque l'aiguille d'injection a pénétré le bouchon doté d'un orifice d'un diamètre légèrement inférieur à celui de l'aiguille, ce qui fait que cette aiguille doit rester en place tant que la pressurisation de la colonne concernée n'est pas revenue à l'équilibre.

Ce procédé n'est donc pas compatible avec l'objectif numéro 2 (cadence élevée du traitement des échantillons).

Le troisième inconvénient (qui concerne certains protocoles d'utilisateurs) est que le système ne permet pas de travailler en anaérobiose : dans le cas de certaines applications qui nécessitent que le dépôt des échantillons dans la partie supérieure du puits se fasse à abri de l'air (oxygène), il est impossible de chasser l'air contenu en faisant un apport de gaz inerte (type hélium ou azote), car dès l'instant où l'aiguille d'injection se rétracte du bouchon d'étanchéité, l'orifice du bouchon remet le volume interne de la partie supérieure du puits en contact avec l'air atmosphérique.

Le quatrième procédé qui fait l'objet de ce brevet, consiste à recouvrir l'ensemble des puits de la microplaque d'une membrane d'élastomère souple perforable (11), maintenue par un couvercle verrouillé (12) et perforé de façon appropriée pour laisser pénétrer les aiguilles (2 à 8) de l'automate auquel ce système est associé (7).

Les avantages de ce système sont au nombre de 4 :

Le premier avantage est de travailler en surpression sur la moitié supérieure de chaque puits (4) de la microplaque, permettant ainsi d'obtenir une bonne reproductibilité dans le traitement des échantillons liquides déposés sur ces puits.

Le second avantage réside dans le fait que, dès l'instant où le ou les liquides ont été déposés dans la partie supérieure des puits, le retrait de l'aiguille d'injection peut se faire immédiatement sans perte de pressurisation : la membrane d'étanchéité (11) se referme et assure une étanchéité permanente des puits (4). Cette caractéristique répond aux critères de cadence exigés par les utilisateurs.

Le troisième avantage réside dans le fait que ce produit, utilisant les

caractéristiques géométriques standards des plaques de microtitrations (1), il peut être associé à tout automate multi-aiguilles programmable utilisant les mêmes caractéristiques. Il est donc possible de programmer le traitement simultané de 8 échantillons, ce qui répond parfaitement aux critères de cadence exigés par les utilisateurs.

Le quatrième avantage est que, du fait d'une étanchéité permanente assurée en tête de puits (4) par la membrane en élastomère (11), il est possible de travailler en anaérobiose, sous gaz inerte (hélium ou azote). Ce gaz inerte, apporté par les aiguilles d'injection (7), chasse l'air ambiant et le remplace. Le retrait des aiguilles (7) de la membrane d'étanchéité ne provoquant pas de remise à air libre des puits, le système reste ainsi en totale anaérobiose. Il est alors possible de prélever les échantillons contenus dans des tubes scellés et de les déposer dans les puits (4), à l'abri de l'air.

L'objectif numéro 3 consiste à faire passer successivement plusieurs liquides sur les moyens de rétentions perméables (5) contenus dans les puits profonds d'une microplaque (1), et, au moment opportun, de dévier le flux de liquide issu des puits de microplaque (10) vers une destination différente de la destination initiale.

Pour cette raison, l'invention concerne également un obturateur de flux mobile (9) permettant une dérivation de la ligne de fluide issue de l'extrémité inférieure de chaque puits doté d'un orifice (6), cette dérivation pouvant s'effectuer à tout moment du déroulement du protocole, selon les critères définis dans le dit protocole (Passage de la figure 3 à la figure 4 page 2/2).

Pour mettre en oeuvre l'ensemble du procédé, l'invention propose un appareil, réunissant dans un même assemblage :

- le premier moyen support supérieur (A) constitué du support de microplaque à puits profonds, ainsi que du système permettant l'étanchéité permanente des microplaques (couvercle, verrou et plaque d'étanchéité en élastomère souple).

- le second moyen support intermédiaire (B) constitué de l'obturateur de flux mobile monté sur deux barres latérales de coulissement et du montant vertical perforé permettant aux aiguilles de l'automate d'entraîner l'obturateur de flux de gauche à droite pour le rendre actif ou de droite à gauche pour le rendre inactif.

- le troisième moyen support inférieur (C) constitué d'un bac de récupération des effluents destinés à être éliminés, situé en droite ligne sous le premier moyen support supérieur (A).

Le premier moyen support supérieur est fixe et détermine la position d'origine des flux. Ces flux (par groupe de 2 à 8) ont pour origine les aiguilles d'injection (7) de l'automate auquel le système est associé. Ces flux traversent les moyens de rétention perméables (5), sous l'effet de la pressurisation effectuée en tête des puits (4). Ces flux sortent des puits par l'orifice situé à leur extrémité (6) et, par gravité, sont acheminés naturellement vers le troisième moyen support inférieur (C), constitué du bac récupérateur, fixe, situé sous le premier moyen support supérieur (A).

A tout moment, et selon le protocole de l'utilisateur, le second moyen support intermédiaire (B), constitué par l'obturateur de flux (9), est intercalé entre le premier moyen support supérieur (A) et le troisième moyen support inférieur (C), grâce à un mouvement particulier des aiguilles (7) de l'automate. Ces aiguilles ont préalablement traversé le montant vertical de l'obturateur de flux (9), sur une épaisseur importante, dans des orifices ajustés prévus à cet effet (14), afin de rigidifier le système aiguille/obturateur lors du déplacement. Ces aiguilles se déplacent alors de gauche à droite afin d'entraîner l'obturateur de flux (9) dont elles sont devenues solidaires, pour intercaler celui-ci entre les deux autres moyens supports. Ces aiguilles se retirent alors, laissant l'obturateur (9) en position active (Fig. 4 page 2/2).

Afin de rendre aux flux leurs destinations d'origine, l'obturateur de flux (9) est déplacé en sens inverse, selon le même procédé que pour sa mise en place, à savoir, dans le cas présent, de droite à gauche.

Cet obturateur de flux (9), provoquant la dérivation des flux de leur destination finale, permettra de réaliser les manipulations suivantes :

- équipé de micro-entonnoirs, reliés à des pompes à circulation (de type péristaltique, par exemple), il permettra de véhiculer les effluents vers différents types d'analyseurs.

- équipé d'un bac de récupération global, il permettra de regrouper l'ensemble des effluents d'une séquence spécifique du procédé (regroupements sur 96 puits).

- équipé de bac à réactifs comportant 8 rangées, il permettra de regrouper l'ensemble des effluents d'une séquence spécifique du procédé par groupe de 12 puits (8 regroupements de 12 puits).

- équipé de bac à réactifs comportant 12 colonnes, il permettra de regrouper l'ensemble des effluents d'une séquence spécifique du procédé par groupe de 8 puits (12 regroupements de 8 puits).

- 5 -

- équipé de microplaque classique (puits individuels de 250µl) ou de microplaque à puits profond (15), il permettra de collecter individuellement les effluents de chaque puits, pour une ou plusieurs séquences du procédé.

- 5 La présente invention est indépendante de l'appareil automatique à laquelle elle est associée et peut ainsi s'adapter à tout appareil automatique programmable réalisant des mouvements en trois dimensions, doté d'aiguilles de prélèvements et d'injections (de 1 à 8 aiguilles).

## REVENDICATIONS

1 . Un dispositif permettant d'automatiser l'usage de plaques de microtitration à puits profonds particulièrement conçues pour la préparation d'échantillons liquides, chimiques ou biologiques, comme étape intermédiaire d'un procédé d'analyse

5 caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un ou plusieurs liquides déposés simultanément ou successivement dans les puits de la dite plaque de microtitration (1), par groupe de 2 à 8 puits (simultanément), par l'intermédiaire d'un appareil automatique doté d'aiguilles d'injection (7) qui perforent une plaque en élastomère souple (8) disposée et maintenue sur la partie supérieure (3) de la dite microplaque (1), assurant une étanchéité permanente de l'ensemble des puits .

10 2 . Un dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte un dispositif d'obturation de flux, comprenant un chariot mobile (9) maintenu par deux rails de coulissement horizontaux, permettant d'intercaler le dit chariot entre les deux moyen support supérieur (A) et inférieur (C), soit de façon autonome par une motorisation, soit par l'action de l'automate sur lequel le dispositif est installé qui permet une dérivation de la  
15 ligne de fluide (10) issue de l'extrémité inférieure de chaque puits fixe doté d'un orifice, vers une destination autre que sa destination initiale, cette dérivation pouvant s'effectuer à tout moment du déroulement du protocole, selon les critères définis dans le dit protocole, par l'utilisateur.

Figure 1

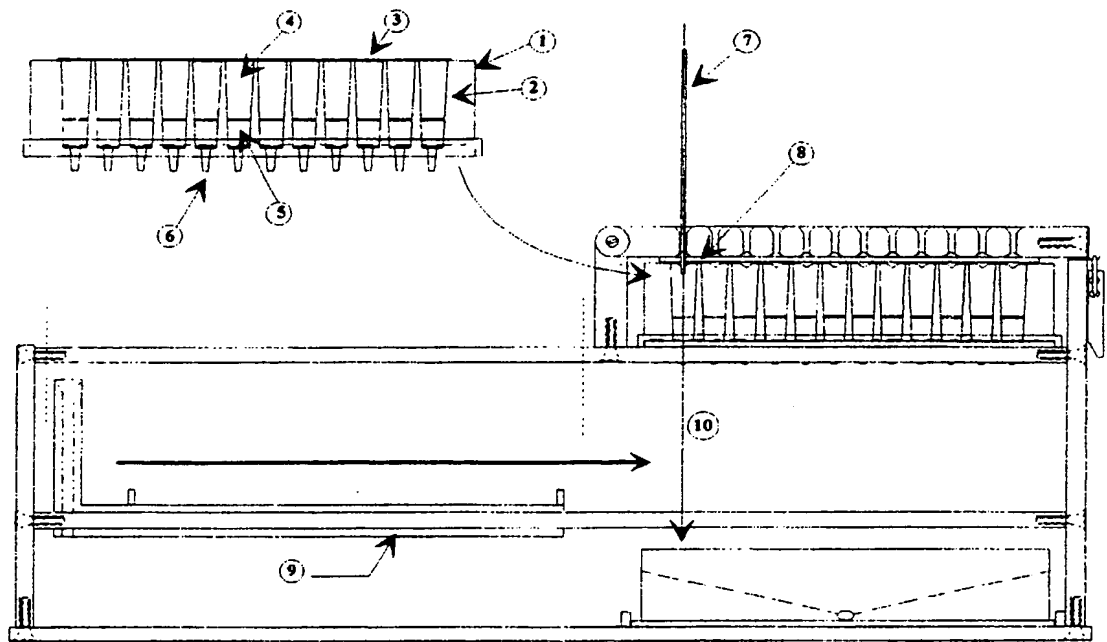


Figure 2

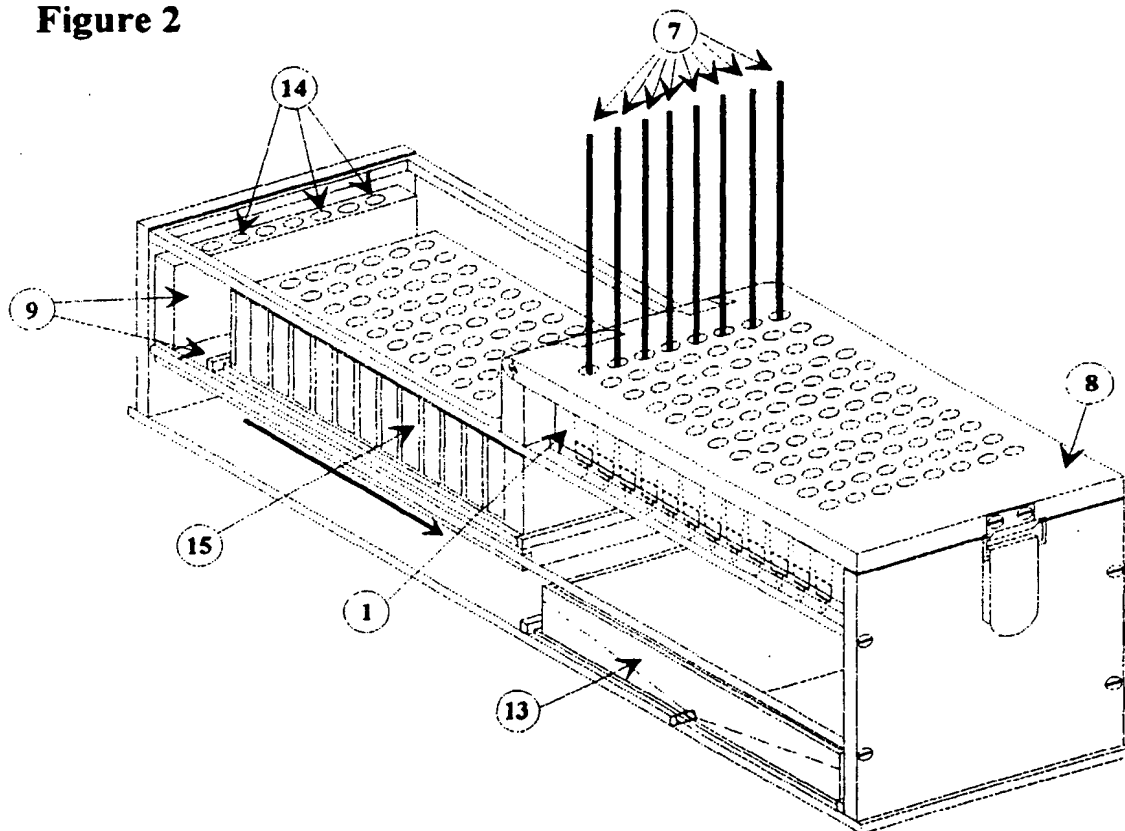




Figure 3

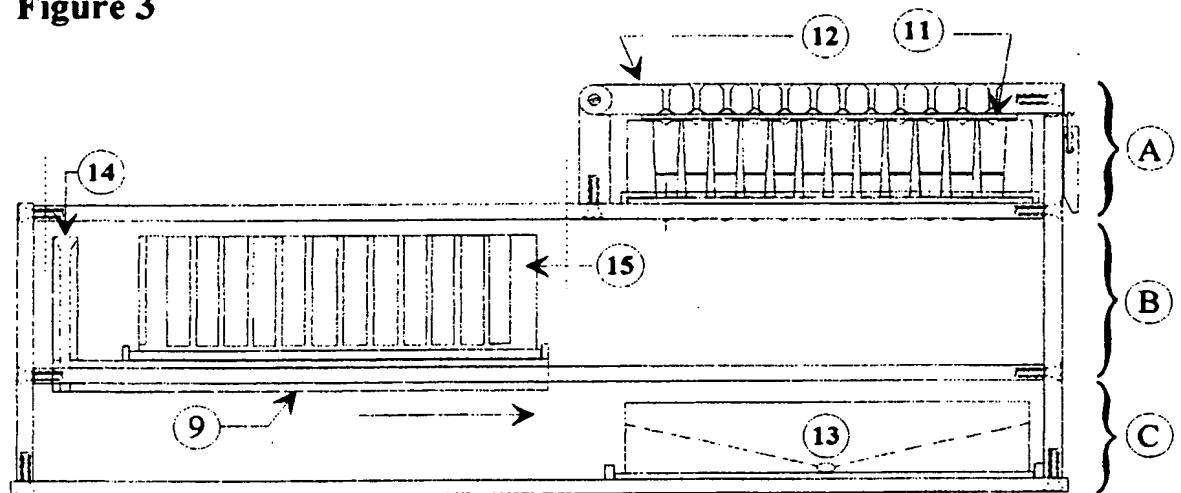


Figure 4

